

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 566**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11731504 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2575837**

54 Título: **Cepas probióticas para su uso en mejorar el sistema nervioso entérico**

30 Prioridad:

28.05.2010 WO PCT/IB2010/001534

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2014

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEGRAIN-RASPAUD, SOPHIE;
GROMPONE, GIANFRANCO;
CAPRONNIER, SANDRINE;
CHAMBAUD, ISABELLE;
SMOKVINA, TAMARA;
DEGIVRY, MARIE-CHRISTINE;
LESIC, BILIANA y
NEUNLIST, MICHEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 508 566 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas probióticas para su uso en mejorar el sistema nervioso entérico

5 **Campo**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden cepas bacteriana ácido lácticas para su uso en modificar el sistema nervioso entérico. Tales composiciones son especialmente adecuadas para tratar y/o prevenir trastornos intestinales tales como estreñimiento y/o enfermedad del intestino irritable.

10

Antecedentes

El síndrome del intestino irritable (SII) o colon espástico es un trastorno intestinal funcional caracterizado por dolor abdominal crónico, molestia, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales en ausencia de cualquier causa orgánica detectable. En algunos casos se informó una inflamación intestinal leve. Puede predominar la diarrea o el estreñimiento, o pueden alternarse (clasificada como SII-D, SII-E, respectivamente). El SII puede empezar después de una infección (post-infeccioso, SII-PI), un acontecimiento estresante en la vida o comienzo de la madurez sin ningún otro indicador médico. En SII, las pruebas clínicas rutinarias no dan anomalías, aunque los intestinos pueden ser más sensibles a ciertos estímulos, tales como la prueba de inflado de globo.

15

20

El SII es una afección muy común que afecta a aproximadamente el 15 % de la población en cualquier momento. Hay aproximadamente dos veces más mujeres que hombres con esta afección. El SII es una fuente de dolor crónico, fatiga y otros síntomas, y aumenta los costes médicos de un paciente, y contribuye al absentismo laboral. Los investigadores han informado de que la alta prevalencia del SII, conjuntamente con elevados costes, produce una enfermedad con un alto coste social. También se considera una enfermedad crónica y puede afectar espectacularmente la calidad de vida de una persona que la padece.

25

Una teoría importante sobre la causa de SII se refiere al sistema nervioso entérico (SNE). El sistema nervioso entérico (SNE) es una subdivisión del sistema nervioso periférico (SNP) que controla directamente las funciones gastrointestinales (GI) y está incorporado en el revestimiento del sistema gastrointestinal. Incluye neuronas eferentes, neuronas aferentes e interneuronas. El funcionamiento estructural y fisiológico del SNE se realiza por células de la glía (astrocitos). El SNE está organizado en dos plexos principales con funciones específicas funcionales.

30

35

El plexo mientérico, localizado entre el músculo longitudinal y circular, contiene neuronas que participan principalmente en el control de la motilidad intestinal. Mediante los músculos intestinales, las neuronas eferentes o motoras controlan la peristasis y el procesamiento del contenido intestinal. Las neuronas motoras que controlan la motilidad están compuestas de dos clases principales:

40

- Neuronas mientéricas excitadoras que liberan acetilcolina (denominadas neuronas inmunorreactivas para colina acetiltransferasa ("ChAT-IR" o "ChAT" o "neuronas ChAT" o "nervios ChAT") y/o sustancia P (SP) para las contracciones, y
- Neuronas mientéricas inhibitoras que liberan óxido nítrico (identificadas como neuronas para óxido nítrico sintasa (NOS-IR)) y/o péptido intestinal vasoactivo (VIP) para la relajación.

45

La colina acetiltransferasa EC 2.3.1.6 es una enzima que se sintetiza dentro del cuerpo de una neurona y se transfiere a la terminación nerviosa. La función de ChAT es unir acetil-CoA con colina, produciendo la formación de la acetilcolina neurotransmisora. Experimentalmente, el efecto sobre la producción de acetilcolina se extrapola de la determinación del número de neuronas ChAT, normalmente un aumento en el número de nervios ChAT es indicativo de un aumento de acetilcolina.

50

El plexo submucoso, localizado entre el músculo circular y la mucosa, contiene neuronas que participan principalmente en el control de funciones de la barrera epitelial intestinal (BEI), tales como la permeabilidad paracelular. En particular, la activación de neuronas entéricas en el plexo submucoso disminuye la permeabilidad paracelular, mediante la liberación de VIP, mientras que la acetilcolina (Ach) aumenta la permeabilidad paracelular, estableciendo la base de un 'ajuste' preciso de la permeabilidad de la BEI por el SNE. Así, con referencia al control neuronal de la permeabilidad paracelular, el aumento de la liberación de VIP por neuronas submucosas aumenta la integridad de la BEI, mientras que el aumento de las neuronas ChAT del plexo submucoso disminuye la resistencia de BEI.

55

60

Aunque actualmente no hay cura para el SII, hay tratamientos que intentan aliviar síntomas, que incluyen ajustes dietéticos, medicación e intervenciones psicológicas.

65

Se informa que los probióticos, en particular cepas bacterianas ácido lácticas, son beneficiosos en el tratamiento y/o la prevención de SII. Ejemplos de tales divulgaciones son los documentos WO 2007/036230, WO 03/010297 y WO 2009/080800. Sin embargo, las cepas bacterianas se seleccionan para su efecto sobre el sistema inmunitario, sobre

la permeabilidad intestinal o sobre la microbiota intestinal y no para su efecto en mejorar la función del SNE. El documento WO 2008/064489 desvela el uso de probióticos para bloquear una corriente de potasio dependiente de calcio de conductancia intermedia que produce un efecto antiinflamatorio. El documento WO 2007/132359 desvela el uso de *Lactobacillus* y un agonista de receptores de cannabinoides y/o un antagonista de receptores de opioides en relación con la percepción de dolor. El documento WO 2006/032542 desvela el uso de *Lactobacillus* para fines analgésicos. Kamm y col., 2004, Neurogastrointest. Motil 16: 53-60 desveló los efectos de *S. boulardii* sobre la disminución de calbindina-28 k (CALB), pero no sobre otros marcadores neuronales del yeyuno de cerdo. Metugriachuk y col., 2006, Rejuvenation Res. 9: 342-345 desvelan que una preparación simbiótica sobre la motilidad del intestino delgado y grueso en ratas Wistar ancianas aumentó significativamente la actividad mioeléctrica del intestino delgado y colon, un aumento de la expresión de ARNm de VIP, pero no tuvo efecto significativo sobre la concentración de VIP.

Por tanto, se necesita más investigación sobre cepas individuales de bacterias probióticas con un efecto beneficioso sobre el SNE para su uso en SII, estreñimiento y/u otros trastornos.

Resumen de la invención

Los inventores emplearon un nuevo sistema modelo para cribar y seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias que tiene un efecto mejorado sobre el sistema nervioso entérico (SNE). Este modelo contiene una (mono)capa de células epiteliales intestinales de carcinoma de colon humano y, sobre el lado basolateral de la monocapa, una mezcla de un cultivo primario de células del sistema nervioso entérico que incluyen neuronas del plexo mientérico y submucoso. Usando este modelo, los efectos de los componentes de calidad alimentaria, en particular cepas de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, sobre el SNE podrían evaluarse midiendo los efectos de la adición apical o luminal de estos componentes sobre la expresión de péptido vaso-intestinal (VIP) y/o nervios que liberan ChAT sobre el lado basolateral.

Por tanto, este modelo permitió cribar y seleccionar nuevas cepas de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para su uso en mejorar la función del sistema nervioso entérico. Tales cepas mejoran la motilidad y peristasis intestinal. Con algunas cepas, el tiempo de tránsito intestinal puede reducirse, que puede tratar algunas afecciones tales como estreñimiento. Con algunas cepas, el tiempo de tránsito intestinal puede aumentarse, que puede tratar algunas afecciones tales como diarrea. Las cepas que aumentan VIP también mejoran la integridad de la barrera epitelial intestinal. Tales cepas son en particular útiles y más eficaces que las cepas existentes en la prevención y/o tratamiento de SII y/o estreñimiento y otros trastornos asociados a una disminución de la función del SNE.

El aumentar el fenotipo colinérgico, en particular la expresión de neuronas ChAT, es de interés terapéutico en patologías del tubo GI asociadas a la inhibición del tránsito colónico. El uso de bacterias ácido lácticas o bifidobacterias seleccionadas por tener un elevado efecto sobre la potenciación de la expresión colinérgica, es decir, ChAT, en neuronas es de interés terapéutico para pacientes estreñidos, y pacientes que padecen SII-E. Por tanto, un grupo de cepas de bacterias ácido lácticas o bifidobacterias de la presente invención aumenta ventajosamente el número de nervios ChAT, que es indicativo de un efecto mejorado sobre la motilidad intestinal, y especialmente es beneficioso para pacientes con SII, en particular pacientes con SII-E, y pacientes que padecen estreñimiento. Este grupo se denomina el grupo B). La buena motilidad requiere un alto número de nervios ChAT, que son responsables de la contracción y tienen un efecto procinético. En algunas realizaciones interesantes para este grupo, los niveles de TEER no disminuyen, ya que la función de BEI y la capacidad de relajar los músculos no se altera preferentemente. El subgrupo según estas realizaciones se denomina grupo B3).

El aumentar VIP mejora beneficiosamente la relajación de los músculos del tubo GI y mejora la BEI, que es beneficioso para pacientes que padecen SII o enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y también para personas ancianas, lactantes y personas obesas. Para tales sujetos, una buena función de BEI es mejor, si no esencial. Aunque los pacientes que padecen SII o EII tienen una secreción en exceso de neuropéptidos tales como VIP, se supone que esto es una respuesta adaptativa del SNE para controlar la inflamación intestinal, para restablecer las funciones de la barrera intestinal y para aumentar la neuroprotección. Un grupo de cepas de bacterias que producen ácido láctico, en particular bifidobacterias, de la presente invención aumenta ventajosamente VIP. Este grupo se denomina el grupo A). En una realización, el nivel de ChAT no aumenta. El grupo según esta realización se denomina grupo A3). Por consiguiente, el nivel de ChAT puede permanecer sustancialmente inalterado o puede disminuir.

Todas las cepas bacterianas citadas en el presente documento se han depositado, según el Tratado de Budapest, ante la CNCM ("Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos", 25 rue du Docteur Roux, París) como autoridad depositaria internacional.

Las cepas encontradas con el método de cribado pertenecientes al grupo B) son DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010). Las cepas que pertenecen al grupo A) son DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) y DN_121_0304 (CNCM I-4318

presentada el 19 de mayo de 2010). La cepa DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) se ha desvelado en la solicitud internacional WO 02/02800 y la cepa DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) se ha desvelado en la solicitud internacional WO 01/01785.

5 Las composiciones que comprenden al menos una de estas cepas seleccionadas son, por tanto, parte de la invención. Se prefiere una composición que comprende una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B) y al menos una cepa que pertenece al grupo A). Una mezcla tal tendrá ventajosamente un efecto mejorado sobre la motilidad, mejorando tanto las contracciones como las relajaciones, y adicionalmente tiene un efecto ventajoso sobre la función de BEI.

10 En el presente documento se describe una composición que comprende al menos una cepa bacteriana, seleccionada preferentemente del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias, para su uso en:

- 15 A) aumentar los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, o
B) aumentar los niveles de neuronas inmunorreactivas para colina acetiltransferasa del sistema nervioso entérico, o
C) disminuir los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico.

20 También se describe una composición que comprende al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 25 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]],
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3]],

30 para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la motilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E,
35 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas.

40 En el presente documento también se describe una composición que comprende al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 45 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]],
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010)[B] - B3]],
para su uso en la administración a sujetos que padecen un trastorno seleccionado del grupo que consiste en:
50 - estreñimiento, SII-E,
- diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI, EII,
- SII, y
- trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas.

55 También se describe una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en mejorar la motilidad gastrointestinal, mejorar la perístasis intestinal y/o disminuir la permeabilidad intestinal.

Según un aspecto, la invención se refiere a nuevas cepas bacteriana seleccionadas del grupo que consiste en:

- 60 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]].

65 Según un aspecto, la invención se refiere a composiciones que comprenden las nuevas cepas.

También se describe una composición que comprende:

- al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias que B) aumenta los niveles de ChAT en el sistema nervioso entérico, y
- al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias que A) aumenta los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el sistema nervioso entérico.

También se describe un método de selección de cepas bacterianas, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) Disponer un co-cultivo de células epiteliales intestinales y células neurónicas entéricas, en el que dichas células epiteliales intestinales están presentes como una monocapa y en el que dichas células neurónicas entéricas están presentes en el lado basolateral de la monocapa,
- b) Añadir cepas bacterianas al lado apical o luminal de la monocapa de células epiteliales intestinales, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 4 a 400 células bacterianas por célula epitelial,
- c) Incubar el co-cultivo con la cepa de bacterias ácido lácticas,
- d) Preferentemente aislar las células neurónicas,
- e) Medir la cantidad de VIP, ChAT, sustancia P, nervios para óxido de nitrógeno, ATP y/o péptido activante de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) producidos por las células neurónicas y opcionalmente adicionalmente la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales.

En este método, la cepa bacteriana pertenece preferentemente al grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.

Descripción detallada

Definiciones

En la presente solicitud, el uso de un compuesto o una composición pretende cubrir el propio uso, opcionalmente con la intención conectada, pero también cualquier comunicación asociada al compuesto o composición con consecuencias comerciales o legales, por ejemplo, publicidad, instrucciones o recomendación sobre el envase de las composiciones, instrucciones o recomendación en soporte comercial tal como prospectos, folletos, pósteres, documentación presentada en soporte a registros reglamentarios para fines de seguridad, fines de eficacia o protección del consumidor, por ejemplo, en administraciones tales como la EFSA en Europa.

En la presente solicitud, los grupos de cepas se refieren a cepas que presentan una propiedad específica o conjunto de propiedades. Una cepa específica puede entonces pertenecer a varios grupos. En la presente solicitud, el término "o" no es excluyente.

En la presente solicitud, una propiedad tal como VIP y/o ChAT se considera sustancialmente inalterada en comparación con un control si la variación no supera el 10 %, preferentemente el 1 % en comparación con el control.

Realizaciones preferidas

En realizaciones preferidas, la composición es para su uso en:

- A3) aumentar VIP, a condición de que no aumente ChAT, o
- B3) aumentar ChAT, a condición de que no aumente VIP, no disminuyendo la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales, o
- C3) disminuir ChAT, a condición de que no disminuya VIP, o
- C2) disminuir ChAT y disminuir VIP.

Por ejemplo, la composición de la invención puede usarse en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la motilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes y personas obesas.

En realizaciones especialmente preferidas, las composiciones pueden:

- A) aumentar los niveles de VIP del sistema nervioso entérico, y usarse en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la motilidad intestinal, o
- B) aumentar los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico, y usarse en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E, o

ES 2 508 566 T3

C) disminuir los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico, y usarse en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D, SII-PI, EII.

La cepa de bacterias puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 5
- DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) [A] - A3)],
 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
 - DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3)],
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
 - 10 - DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)],
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)].

En una realización, la cepa bacteriana está seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 15
- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
 - DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3)], y
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
- y la composición es para su uso en:
- 20
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
 - tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas.

En una realización, la cepa bacteriana está seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 25
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)],
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)],

30 y la composición para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E.

En una realización, la cepa de bacteria está seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 35
- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
 - DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3)], y
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
- y la composición es para su uso in:

40 A) aumentar los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, preferentemente para su uso en A3) aumentar VIP, a condición de que no aumente ChAT.

En una realización particular de esta realización, la composición es para su uso en:

- 45
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
 - tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas.

En una realización, la cepa de bacteria está seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 50
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)],
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)],
- y la composición es para su uso en:

55 B) aumentar los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico, preferentemente B3) aumentar ChAT, a condición de que no aumente VIP.

En una realización particular de esta realización, la composición es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E.

60 Más detalles de cepas bacterianas

Como se ha mencionado anteriormente, la composición comprende al menos una o dos cepas específicas de bacterias, preferentemente bacterias ácido lácticas. Como se expone en las reivindicaciones, se encontró que dicha cepa bacteriana específica era capaz de afectar los niveles de VIP y/o afectar los niveles de nervios ChAT en un modelo de co-cultivo que representa la interacción entre el intestino y el SNE.

65

Se usó un modelo de co-cultivo, descrito más abajo en más detalle, para seleccionar *in vitro* cepas de bacterias ácido lácticas o bifidobacterias con estas propiedades. Se cribaron 102 cepas que pertenecían a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium*.

5 Las cepas del grupo B) con elevado efecto sobre ChAT normalmente mejorarán la motilidad intestinal. Las cepas del grupo B3) con elevado efecto sobre ChAT, excluyendo las cepas en las que VIP no aumenta (es decir, VIP está sustancialmente inalterado o VIP reducido), representan una realización preferida específica. Las cepas de estos grupos son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o la
10 prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, que pueden frecuentemente padecer estreñimiento. Con referencia al aumento de la motilidad, se favorecerían las cepas que aumentan la expresión de ChAT. Esta propiedad parece ser muy rara. De forma interesante, solo se encontraron tres cepas que aumentaron ChAT estadísticamente. Éstas se denominan las cepas del grupo B) o grupo B3). Las cepas del grupo B) o grupo B3) comprenden las cepas DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010), DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010). Tales cepas mejoran beneficiosamente la motilidad, especialmente las contracciones. Se prefiere que no se reduzca la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales. Una propiedad tal puede ser indicativa de una función de barrera adecuada. La cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) disminuyó significativamente los niveles de VIP, mientras que las otras dos cepas no tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de VIP. Como una disminución en VIP puede tener un efecto adverso sobre la BEI, se examinó con un modelo *in vitro* con una monocapa de células epiteliales intestinales si la incubación de esta cepa produjo o no una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Esto resultó no ser el caso, que indica que la función de BEI no se altera.

25 Con referencia a la relajación de los músculos y el refuerzo de la función de BEI, que es beneficiosa en pacientes con SII y EII, se favorecerían cepas que aumentarían la expresión de VIP (que tendrían además efectos antiinflamatorios). Tales cepas se denominan cepas del grupo A). En una realización preferida, las cepas del grupo A) no aumentan la expresión de ChAT (es decir, ChAT está sustancialmente inalterado o ChAT se reduce). Tales cepas se denominan cepas del grupo A3). Las cepas de estos grupos son normalmente beneficiosas para el
30 tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o para el tratamiento y/o la prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas. Las cepas del grupo A) o grupo A3) comprenden cepas DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010). Es interesante observar que
35 todas las cepas que tienen esta propiedad son bifidobacterias, excepto una: DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010). Además, usando otro modelo *in vitro* con una monocapa de T84 y la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), se encontró especialmente que las cepas DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) del grupo A) o A3) tenían un efecto protector sobre la BEI en presencia de LPS. Por tanto, estas cepas particulares son especialmente preferidas.

Según una realización, las cepas permiten disminuir los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico. El grupo de cepas correspondiente se denomina el grupo C). En una realización particular, las cepas permiten disminuir ChAT, a
45 condición de que no disminuya VIP (es decir, VIP no se altera sustancialmente o VIP aumenta). Este grupo se denomina el grupo C3). En una realización particular, las cepas permiten disminuir ChAT disminuyendo VIP. Estas cepas se denominan el grupo C2). Las cepas del grupo C3) son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o la prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, que pueden frecuentemente sufrir diarrea. Las cepas del grupo C2) son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D, SII-PI y EII. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o la prevención de trastornos encontrados en personas ancianas que pueden frecuentemente sufrir tales afecciones, especialmente diarrea.

55 La presente invención también engloba el uso de las cepas anteriormente mencionadas, pero también cepas mutantes o cepas genéticamente transformadas derivadas de una cualquiera de las cepas parentales que todavía tienen actividad sobre VIP y afectan nervios ChAT. Estas cepas mutantes o genéticamente transformadas pueden ser cepas en las que se han mutado uno o más genes endógenos de la cepa parental, por ejemplo, para modificar alguna de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tubo gastrointestinal, su post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental por uno o más genes de interés, por ejemplo, con el fin de dar a dicha cepa características fisiológicas adicionales, o para permitir que exprese proteínas de interés terapéutico o para vacunas que se desean administrar mediante dichas cepas.

65

Preferentemente se usa una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B), preferentemente al grupo B3), y al menos una cepa que pertenece al grupo A), preferentemente al grupo A3). Una mezcla tal tendrá ventajosamente un efecto mejorado sobre la motilidad, además de sobre la BEI.

5 Modelo de co-cultivo y ensayo de cribado

En el presente documento se describe un método de selección de cepas de bacterias ácido lácticas, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) Usar un co-cultivo de células epiteliales intestinales y células neurónicas entéricas, en el que las células epiteliales intestinales están presentes como monocapa y en el que las células neurónicas entéricas están presentes en el lado basolateral de la monocapa,
- 15 b) Añadir bacterias ácido lácticas al lado apical o luminal de la monocapa, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 4 a 400 células bacterianas por célula epitelial,
- c) Incubar el co-cultivo con las bacterias ácido lácticas,
- d) Preferentemente aislar las células neurónicas, y
- e) Medir la cantidad de al menos un neurotransmisor seleccionado del grupo que consiste en VIP, ChAT, sustancia P y óxido de nitrógeno, ATP, PACAP producidos por las células neurónicas, y opcionalmente adicionalmente la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales.

20 De acuerdo con el reflejo peristáltico, el SNE contiene circuitos conectados que consisten en neuronas motoras excitadoras ascendentes y que liberan acetilcolina y sustancia P, que contrae el músculo liso mediante los receptores muscarínicos, y en neuronas inhibitoras descendentes que liberan una mezcla de transmisores, como NO, ATP, VIP y PACAP, todos los cuales inhiben el músculo circular.

25 Cultivo celular

Una forma adecuada para establecer el co-cultivo con una monocapa de células epiteliales intestinales polarizadas se facilita en el Ejemplo 1 y también se describe en J. Chevalier y col., 2008, J. Physiol. 586 1963-1975.

30 Son adecuados todos los cultivos de células epiteliales intestinales que forman monocapas, tales como Caco-2, T84, HT29 y TC7. Preferentemente se usan células T84.

35 Como células primarias del sistema nervioso entérico, se aíslan preferentemente células de fetos de mamífero no humano, preferentemente roedores, más preferentemente ratas.

Preferentemente, las cepas bacterianas probadas se cultivan hasta la fase exponencial tardía en un medio de crecimiento adecuado y se lavan. Preferentemente, las bacterias se añaden al lado apical del co-cultivo a una cantidad de 4 a 400 bacterias / célula epitelial, más preferentemente 10 a 100 bacterias / célula epitelial, incluso más preferentemente 30 a 50 bacterias / célula epitelial. Preferentemente, como control, no se añaden bacterias. Preferentemente, como control positivo se usa butirato 1 mM o KCl 40 mM.

45 Preferentemente, la etapa de incubación se realiza a aproximadamente 37 °C. Preferentemente, la etapa de incubación dura 1 a 72 h, más preferentemente 2 a 36 h, incluso más preferentemente 4 a 12 h.

Preferentemente, después de la co-incubación, el compartimento que contiene células epiteliales y bacterias se saca y las células neuronales primarias se incuban durante 12 a 48 h, más preferentemente durante 20 a 28 h, en una estufa de incubación humidificada que contiene 5 % de CO₂.

50 Preferentemente, la cantidad de nervios ChAT frente a nervios totales se mide usando tinción inmunohistoquímica, usando anti-enolasa específica de neuronas (NSE) para contar el número total de neuronas y anti-colina acetiltransferasa para contar los nervios ChAT.

55 Preferentemente, el VIP se determina por ELISA después de recoger las células neuronales y extraer las proteínas con la presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas.

Más detalles sobre composiciones

60 La invención engloba composiciones con cepas bacterianas que permiten los usos o propiedades anteriormente citados. La invención también engloba composiciones que comprenden una o más de las siguientes cepas (que engloban mutantes o cepas genéticamente transformadas derivadas de las mismas):

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]],
- 65 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)],

para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la motilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes o personas obesas,

normalmente cuando se administran *in vivo* a un sujeto.

En las composiciones de la invención, dichas cepas pueden usarse en forma de bacterias completas que pueden estar vivas o no. Alternativamente, pueden usarse en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; las fracciones bacterianas adecuadas para este uso pueden elegirse, por ejemplo, probando sus propiedades de alivio de los efectos sobre niveles de VIP y niveles de nervios ChAT del modelo de co-cultivo descrito en la presente invención. Preferentemente, las células bacterianas están presentes como células viables vivas.

Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para administración, en particular administración por vía oral. Esto incluye, por ejemplo, sólidos, semi-sólidos, líquidos y polvos. Generalmente se prefieren composiciones líquidas para administración más fácil, por ejemplo, como bebidas.

La composición puede comprender, por ejemplo, al menos 10^5 , preferentemente al menos 1×10^6 , ufc por g de peso seco, de al menos una cepa bacteriana, preferentemente de las cepas bacterianas que se han mencionado anteriormente. Éstas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.

Si las bacterias están en forma de bacterias vivas, la composición puede comprender normalmente 10^5 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc), preferentemente al menos 10^6 ufc, más preferentemente al menos 10^7 ufc, todavía más preferentemente al menos 10^8 ufc, y lo más preferentemente al menos 10^9 ufc por g de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, esto se corresponde generalmente con 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc), preferentemente al menos 10^5 ufc, más preferentemente al menos 10^6 ufc, todavía más preferentemente al menos 10^7 ufc, y lo más preferentemente al menos 10^9 ufc/ml.

Ejemplos de las composiciones de la invención son composiciones nutricionales, que incluyen productos alimenticios y en particular productos lácteos.

La composición puede ser, por ejemplo, un producto lácteo, preferentemente un producto lácteo fermentado. La administración en forma de un producto lácteo fermentado tiene la ventaja adicional de bajos niveles de lactosa, que es adicionalmente beneficioso para el SII. Opcionalmente, pueden estar presentes otras cepas de bacterias ácido lácticas. El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de un polvo seco obtenido secando el líquido fermentado. Preferentemente, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, que no se ha sometido a etapas de tratamiento térmico extremo, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en la forma viva. Preferentemente, el producto fermentado es un producto lácteo, más preferentemente leche fermentada y/o suero de la leche fermentado. Preferentemente, la composición nutricional es yogurt, o leche fermentada en forma cuajada, batida o bebible. Preferentemente, el producto fermentado es un queso. Preferentemente, el producto fermentado es una verdura fermentada, tal como soja fermentada, cereales y/o frutas en formas cuajadas, batidas o bebibles.

Preferentemente, la presente composición nutricional es un alimento infantil, una leche de inicio o una leche de continuación. Preferentemente, la presente composición es un producto nutracéutico o farmacéutico, un suplemento nutricional o alimento médico.

Las composiciones nutricionales de la invención también incluyen complementos alimenticios, y alimento funcional. Un "complemento alimenticio" designa un producto preparado a partir de compuestos normalmente usados en alimentos, pero que está en forma de comprimidos, polvo, cápsulas, poción o cualquier otra forma normalmente no asociada a alimentos, y que tiene efectos beneficiosos para la salud. Un "alimento funcional" es un alimento que también tiene efectos beneficiosos para la salud. En particular, los complementos alimenticios y el alimento funcional pueden tener un efecto fisiológico - protector o curativo - contra una enfermedad, por ejemplo, contra una enfermedad crónica.

Se prefiere una composición que comprende una mezcla de al menos una cepa de bacteria ácido láctica o bifidobacteria que aumenta nervios ChAT y al menos una cepa de bacteria ácido láctica o bifidobacteria que aumenta los niveles de VIP. Una mezcla tal tendrá ventajosamente un efecto mejorado sobre la motilidad, además de sobre BEI.

Se prefiere una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B), preferentemente B3), y al menos una cepa que pertenece al grupo A), preferentemente A3). Una mezcla tal tendrá ventajosamente un efecto mejorado sobre la motilidad, además de sobre BEI. Por tanto, la presente invención también se refiere a composiciones que comprenden:

5

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)],
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)]; y

10

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:
- DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) [A] - A3)],
- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],
- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3)], y
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)].

15

Las composiciones de la invención también pueden comprender una o varias de otras cepas de bacterias ácido lácticas, probióticas o no, por ejemplo, una o más cepas bacterianas seleccionadas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y bifidobacterias. En particular, esta(s) otra(s) cepa(s) puede(n) incluir una o más cepas de *Streptococcus thermophilus*, y/o una o más cepas de *Lactobacillus bulgaricus*.

20

Aplicación

25

En una realización se encontró que las cepas de la presente invención aumentaban el número de nervios ChAT. La colina acetiltransferasa EC 2.3.1.6 es una enzima que se sintetiza dentro del cuerpo de una neurona y se transfiere a la terminación nerviosa. La función de la colina acetiltransferasa es unir acetil-CoA con colina, produciendo la formación del neurotransmisor acetilcolina. Se usa como marcador inmunohistoquímico para neuronas motoras. Los efectos sobre el nervio ChAT producen contracciones mejoradas, produciendo perístasis mejoradas. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención capaces de aumentar los nervios ChAT se administran ventajosamente para mejorar el SNE, para mejorar o potenciar la perístasis, para mejorar la motilidad intestinal y/o para reducir el tiempo de tránsito gastrointestinal. El aumentar el fenotipo colinérgico es de interés terapéutico en patologías GI asociadas a la inhibición del tránsito colónico. En particular, diversos estudios han mostrado que ralentizar el tránsito podría asociarse a una expresión reducida de neuronas ChAT. En particular, (i) pacientes gravemente estreñidos generalmente tienen una menor cantidad de nervios ChAT, (ii) la producción de ACh mientérico disminuyó significativamente tanto durante el transcurso de la infección como después de la infección (PI), (iii) durante el envejecimiento se ha informado de una reducción de la proporción de neuronas colinérgicas.

35

40

En este contexto, el usar cepas de bacterias, preferentemente bacterias ácido lácticas o bifidobacterias para potenciar la expresión colinérgica en neuronas, podría ser de interés terapéutico futuro para pacientes gravemente estreñidos y SII-E. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran ventajosamente a pacientes que padecen SII-E y/o estreñimiento. Las cepas que son más útiles son las cepas del grupo B) o B3) mencionadas anteriormente.

45

50

En una realización particular, las cepas y composiciones de la presente invención son usadas por o para personas ancianas. Las personas ancianas en la presente invención se definen como ser humano con una edad por encima de los 65 años, preferentemente por encima de los 70 años, preferentemente por encima de los 75 años, preferentemente por encima de los 80 años, preferentemente por encima de los 85 años. Las personas ancianas normalmente tienen un número disminuido de neuronas ChAT en el sistema nervioso entérico localizado en el colon, lo más preferentemente en el colon transversal. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran ventajosamente para tratar y/o prevenir SII, preferentemente SII-E, y/o estreñimiento para personas ancianas. Las cepas capaces de aumentar nervios ChAT son el grupo B), tal como la cepa DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010). Preferentemente no disminuyen VIP, ya que VIP es necesario para una buena función de BEI y para la relajación del tubo GI, otra parte importante de la motilidad del tubo GI tal como la perístasis. Las cepas que cumplieron este criterio fueron DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010). Sin embargo, la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) tampoco afectó negativamente la función de BEI como se ha determinado por experimentos de TEER, ya que TEER no disminuyó.

55

60

65

En una realización se encontró que las cepas de la presente invención aumentaban los niveles de VIP. Con respecto al aparato digestivo, VIP induce la relajación de músculo liso (esfínter esofágico inferior, estómago, vesícula biliar), estimula la secreción de agua en el jugo pancreático y bilis, y produce la inhibición de la secreción de ácidos y la absorción de la luz intestinal. Su función en el intestino es estimular enormemente la secreción de agua y electrolitos, además de dilatar el músculo liso intestinal, dilatar los vasos de sangre periférica, estimular la secreción de bicarbonato pancreático e inhibir la secreción de ácidos gástricos estimulados por gastrina. Estos efectos funcionan juntos para aumentar la motilidad. Por tanto, este hallazgo es indicativo de que estas cepas tienen un efecto mejorado sobre la motilidad intestinal, en particular la parte de relajación de la motilidad. VIP también

aumenta beneficiosamente la función de BEI. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran ventajosamente para mejorar el SNE, para mejorar o potenciar la peristasis, para reducir la permeabilidad, para mejorar la motilidad intestinal y/o para reducir el tiempo de tránsito gastrointestinal. Por tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran ventajosamente para su uso en o a pacientes que padecen:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la motilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-E, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas ancianas, lactantes y personas obesas.

Las cepas que son las más útiles son las cepas del grupo A) o A3) mencionadas anteriormente.

Detalles o ventajas de la presente invención pueden encontrarse en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

EJEMPLO 1: CRIBADO DE PROBIÓTICOS EN UN MODELO DE CO-CULTIVO QUE IMPLICA CÉLULAS EPITELIALES Y CÉLULAS NEURONALES ENTÉRICAS

Cultivo celular

Se compraron ratas Sprague-Dawley preñadas (CERJ, Le Genest St Isle, Francia y Janvier-Breeding Center, Bélgica) y se sacrificaron por una sobredosis de CO₂ seguido de corte de las arterias carótidas. Se extrajeron los embriones (35-45 por aislamiento de 3 ratas preñadas) y se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron los intestinos delgados de los embriones y finalmente se cortaron en dados en HBSS (Sigma, Francia). Se recogieron fragmentos de tejido en 5 ml de medio (medio DMEM-F₁₂ 1:1) y se digirieron a 37 °C durante 15 min en 0,1 % de tripsina (Sigma). La reacción de tripsina se detuvo añadiendo 10 ml de medio que contenía 10 % de suero bovino fetal y luego se trató por DNasa I (0,01 %, Sigma) durante 10 min a 37 °C. Después de triturar con una pipeta de 10 ml, las células se centrifugaron a 750 r.p.m. durante 10 min. Se contaron las células y luego se sembraron a una densidad de 2,4x10⁵ células/cm² sobre placas de 24 pocillos previamente recubiertas durante 6 h con una disolución de gelatina (0,5 %, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Después de 24 h, el medio se substituyó con un medio sin suero (DMEM-F₁₂ 1:1 que contiene 1 % de suplemento de N-2 (Life Technologies, Francia). Las células se mantuvieron en cultivo durante 14 días para obtener cultivo primario de sistema nervioso entérico (SNE). La mitad del medio se substituyó cada dos días. A los 14 días, las células neuronales primarias estuvieron listas para el establecimiento del modelo de co-cultivo.

La línea de células T84 (EATCC) se cultivó en DMEM-F₁₂ (1:1, GIBCO) complementado con 10 % de SBF inactivado con calor y 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células se sembraron en filtros Transwell® de 12 pocillos (Corning, NY USA) a una densidad de 2x10⁵ células/inserto y se cultivaron para obtener confluencia.

Un día después de que las células epiteliales llegaran a confluencia, los filtros Transwell® se transfirieron a las placas de 12 pocillos sembradas en el fondo con células nerviosas entéricas. Se co-cultivaron células epiteliales y neuronales en el medio para células epiteliales.

Crecimiento de cepas de bacterias

Se cultivaron bacterias durante 16 h en TGYH para bifidobacterias y lactobacilos, excepto la cepa DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) que se cultivó sobre medio MRS + cisteína, se lavó en PBS dos veces y se ajustó a 4x10⁸ ufc/ml con el fin de añadir coherentemente el mismo volumen de suspensión bacteriana al filtro. Las cepas se añadieron al compartimento del filtro a una MOI de 40 bacterias / célula epitelial. Como control no se añadieron bacterias.

Después de 8 h de co-incubación, el compartimento del filtro que contenía células epiteliales y bacterias se sacó y las células neuronales primarias se incubaron durante 24 h en una estufa de incubación humidificada que contenía 5 % de CO₂. En los pocillos de control, las células neuronales se estimularon con butirato 1 mM y KCl 40 mM cuando se realizaron las mediciones de ChAT y VIP, respectivamente.

Tinción inmunohistoquímica. Medición de nervios ChAT

Después de la incubación se realizó inmunohistoquímica para detectar poblaciones de células neuronales. Después de la fijación de células (en PBS 0,1 M que contenía 4 % de paraformaldehído durante 1 h a temperatura ambiente),

las células se lavaron 3 veces en PBS, luego se permeabilizaron durante 30 min en PBS/NaN₃ que contenía 0,5 % de Triton X-100 y 4 % de suero de caballo. Se diluyó anticuerpo primario : anti-enolasa específica de neurona de conejo (NSE) (1:2000; Biovalley, Francia) y anti-colina acetiltransferasa de conejo en PBS/NaN₃, 0,5 % de Triton X-100 y 4 % de suero de caballo y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de la incubación con antisuero primario, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 3 h con anti-IgG de conejo de burro conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200 Immunotech, Francia) y 7-amino-4-metil-cumarin-3-acetato, respectivamente. Los especímenes se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia Olympus IX50 acoplado a cámara de vídeo blanca (Mod. 4910, Cohu Inc, Alemania) conectada a un ordenador macintosh mediante una tarjeta capturadora de fotogramas (Scion Imagen, SL Microtest).

Mediciones de VIP:

Para la determinación de VIP, células neuronales se recogieron de las placas de 12 pocillos, las proteínas se extrajeron usando tampón de lisis RIPA (Millipore, Francia) que contiene mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Francia) y se midieron los niveles de VIP por ELISA (Bachem, Alemania).

Resultados

La respuesta diferencial de neuronas entéricas primarias en marcadores de VIP y ChAT tras la interacción de algunas de las 102 cepas probióticas que incluyen bacterias ácido lácticas y bifidobacterias se muestra en la Tabla 1. Solo se muestran algunas cepas que pertenecen al grupo A3) o B3) o C3). Adicionalmente se menciona que se mostró que 26 cepas no tuvieron efecto significativo sobre VIP y ChAT (incluyendo las cepas *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *Lactobacillus casei* Shirota), se mostró que 11 cepas que pertenecen al grupo C2) redujeron tanto VIP como ChAT (incluyendo la cepa *Bifidobacterium longum* W11 de Alfa-Wass (LMG P-21586)), 10 cepas disminuyeron VIP y no tuvieron efecto sobre ChAT (incluyendo las cepas de punto de referencia *Bifidobacterium infantis* UCC 3564, *Bifidobacterium longum* Bb536, *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* Bbl2 (DSM 15954) y *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* Bi-07 (ATCC SD5220) y 41 cepas que pertenecen al grupo C3) disminuyeron ChAT y no tuvieron efecto sobre VIP que incluye las cepas *Lactobacillus johnsonii* La1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843), *Lactobacillus reuteri* SD 2122 (ATCC 55730)).

Tabla 1: Efecto de la incubación con bacterias ácido lácticas y bifidobacterias sobre los niveles de VIP y de ChAT en un modelo de co-cultivo con monocapa de células epiteliales y células primarias del SNE.

Grupo	Número DN de especies (número de CNCM)	VIP			ChAT		
		Diferencia estimada* frente al control	valor de p	Media empírica	Diferencia estimada frente al control	valor de p	Media empírica
1	DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Bifidobacterium bifidum</i>	-0,0097	0,9	0,0790	0,2709	0,09	0,1796
1	DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-0,0389	0,7	0,0397	0,3151	0,10	0,2535
1	DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-0,1329	0,09	-0,2221	0,2847	0,02	0,2796
2	DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) <i>Bifidobacterium lactis</i>	0,2345	0,01	0,2001	-0,2615	0,05	-0,0825
2	DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Bifidobacterium breve</i>	0,2248	0,01	0,2020	-0,5450	0,00	-0,5723
2	DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) <i>Bifidobacterium breve</i>	0,2715	0,02	0,3552	-0,3632	0,01	-0,1281
2	DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,5976	0,00	0,6813	-0,6269	0,00	-0,3918

* Los valores se facilitan como una diferencia en comparación con el control, al que no se añadieron cepas bacterianas.

Aunque la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) disminuye los niveles de VIP, resultó con un modelo de TEER (Hirotsu y col., 2008, Yakugaku Zasshi Sep; 128(9):1363-8) que la incubación con la cepa durante 4 ó 6 h no redujo significativamente los valores de TEER, incluso en presencia de lesión frente al

5 control. En resumen, las bacterias se cultivaron en TGYH. Las suspensiones de cultivo se lavaron con PBS. Posteriormente, las bacterias (100 ufc/célula) se añadieron al lado apical de las monocapas de células T84. Después de 2 h de incubación se añadió LPS (L4516, - EPEC - 0127: B8) sobre el lado apical a 40 ng/ml o no se añadió. Entonces, después de 2 h y 4 h de incubación, el valor de TEER se midió para evaluar la función de la barrera epitelial. Todos los experimentos se realizaron tres veces independientemente y por triplicado en presencia y en ausencia de LPS. El valor de T84 a t=0 se fijó al 100 %. En ausencia de LPS, TEER a T4 fue del 98,7 % y a T6 el 100,2 % con la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010); para T84 solo esto fue todavía del 100 %. En presencia de LPS, T84 de control a T4 fue del 56,2 % en comparación con t=0 y con la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) el 47,9 %; a T6 el control de T84 fue del 46,7 % y con la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) del 52,2%.

15 Usando este mismo modelo de TEER, especialmente la cepa DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), que pertenecen todas al grupo A3), mostraron buenos resultados sobre la función de la barrera intestinal como se evalúa por TEER en presencia de LPS. Véase la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados de TEER en presencia de LPS de bacterias seleccionadas que muestran los mejores resultados

Cepa		TEER T4/TEER T0 (%)		TEER T6/ TEER T0 (%)	
		Significancia	Media empírica	Significancia	Media empírica
Control de T84			56,20		46,76
DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000)	<i>B. lactis</i>	***	71,27	***	51,03
DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999)	<i>B. breve</i>	***	70,70	***	55,87
DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>L. plantarum</i>	***	65,84	***	64,37
DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>B. breve</i>	***	84,44	***	80,38
*** valor de p < 0,05					

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010)
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) y
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010)
- 10 2. Composición que comprende al menos una cepa de la reivindicación 1.
3. Composición que comprende:
- 15 - al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:
 - DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010); y
 - al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:
20 - DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000),
 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), y
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010).
- 25 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en la que la composición es una composición nutricional, un producto nutracéutico o farmacéutico, un suplemento nutricional o un alimento médico.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la composición es un producto lácteo, un alimento infantil, una leche de inicio o una leche de continuación.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la composición es un producto lácteo fermentado.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la composición comprende al menos 10^5 , preferiblemente al menos 1×10^6 , ufc de al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias por g de peso seco.